

ATM 遺伝子群の発現と機能解析

— トリ ATM, FRP 遺伝子の組織別, 発生段階別発現量の解析及びトリ ATM 遺伝子の
ノックアウト細胞でのテロメラーゼ活性の測定 —

金沢大学医学部医学科外科学第一講座 (主任: 渡辺 洋宇教授)

金沢大学がん研究所細胞制御研究部門細胞分子病態研究分野 (主任: 山本 健一教授)

加 藤 秀 明

毛細血管拡張性小脳失調症 (ataxia-telangiectasia) は, 原発性免疫不全症に分類される常染色体劣性遺伝病であり, その臨床症状は神経症状, 免疫不全, 高発癌性, 細胞の放射線感受性, 早期老化など多岐にわたる. この原因遺伝子 *atm* (ataxia-telangiectasia mutated) は, 細胞内情報伝達経路において *p53* の上流に存在し, 多様な役割を担うことが今までにわかっている. また, *atm* がコードする蛋白質, ATM はフォスファチジルイノシトール3キナーゼ (phosphatidylinositol 3-kinase) ファミリーに属し, FRP (FKBP-rapamycin associated protein) 遺伝子等, 類縁遺伝子は DNA 修復, 細胞周期チェックポイント, 減数分裂の制御に関係している. 本研究では, その *atm*, *frp* の発現量及び機能について解析した. トリ精巣由来 cDNA ライブラリーから各因子をコードする cDNA (*atm* 603bp, *frp* 513bp) を分離し, 構造決定を行った後, 決定した塩基配列に基づきトリの各組織における発現量をノーザンブロットハイブリダイゼーションで解析した. *atm* では脳 (brain) に, *frp* では脳, 心臓 (heart), 精巣 (testis) で発現が確認された. また, ニワトリ産卵 5, 7, 9, 11 日目における *atm*, *frp* の発生段階別発現量につき同様にノーザンブロットハイブリダイゼーションで解析した結果, *atm* では 7 日目に, *frp* では 5 日目に強い発現がみられた. また, ATM および FRP 遺伝子を, トリ B リンパ球細胞株 DT40 細胞でノックアウトしたが, FRP ノックアウト細胞は, ホモの段階で作成不可能であった. これは, FRP 遺伝子の欠除が胚細胞致死 (embryonic lethal) である可能性が示唆された. 作成した ATM ノックアウト細胞は, 野生型 DT40 細胞と比較して細胞増殖速度の低下を認めると共に, 有意にテロメラーゼ活性が増加していた. 以上の結果より, トリ *atm* およびその相同遺伝子 *frp* は発生の初期段階より発現し, 主に脳に強く発現することはこの遺伝子群と小脳失調などの神経変性との関連が示唆され, また, その発現に関してはそれぞれ異なった調節をうけるものと考えられた. さらに, ATM 遺伝子の機能として, 細胞の癌化と関連するテロメラーゼ活性を抑制する可能性が示唆された.

Key words ataxia-telangiectasia, ataxia-telangiectasia mutated, phosphatidylinositol-3 kinase, FKBP-rapamycin associated protein, telomerase activity

毛細血管拡張性小脳失調症 (ataxia-telangiectasia, A-T)¹⁾²⁾ は, 多彩な症状を呈する常染色体劣性遺伝病であるが, ホモ接合, ヘテロ接合に共通して癌家族歴, 特に乳癌の罹患頻度が高いことが知られている³⁾⁴⁾. ヘテロ接合の保因者では免疫不全症状がないにもかかわらず乳癌の発生率は正常女性の約 5 倍にもおよび⁵⁾, A-T 遺伝子異常の全乳癌患者に対する関与は 7% 以上と報告されている. それゆえ, その原因遺伝子 *atm* (ataxia-telangiectasia mutated) が発癌機構に密接に関与していることが示唆され, Savitsky ら⁶⁾⁷⁾ のグループにより 1995 年, ポジショナルクローニング (positional cloning) によって同定されたことは, 今後の乳癌をはじめとする腫瘍の原因, 病態解明において大きな進歩であったと言える. それ以来, この多機能遺伝子

に関する研究が数多く報告されている.

癌抑制遺伝子として知られる *p53* 遺伝子は, 放射線 DNA 障害や癌遺伝子産物などによるストレスで, 細胞周期停止やアポトーシス (apoptosis) を引き起こすが, ATM 遺伝子はその細胞内情報伝達系で *p53* 遺伝子の上流に存在し, 選択的に *p53* 遺伝子を活性化する働きがあることがわかっている⁸⁾⁹⁾. 今回我々は, その ATM 遺伝子の発現量および機能を解析することを目的として実験を行った. 機能解析を進める上で ATM 遺伝子の細胞レベルでのノックアウトを行うにあたり, 当教室では高頻度で相同 DNA 遺伝子組み換えをおこなす細胞 (トリ B リンパ球細胞株 DT40 細胞¹⁰⁾) を使用する計画であったので, まず, 未だ知られていなかったトリでの ATM, FRP (FKBP-rapamycin

平成 10 年 11 月 24 日受付, 平成 11 年 1 月 25 日受理

Abbreviations: A-T, ataxia-telangiectasia; ATM, ataxia-telangiectasia mutated; bp, base pairs; CHAPS, 3-[(3-cholamidopropyl) dimethylammonio] -1-propane sulfonate; FKBP, FK-506 binding protein; FRP, FKBP-rapamycin associated protein; PBS, phosphate buffer saline; PI3, phosphatidylinositol 3; rpm, rotation per minute; TBE, Tris-borate EDTA; UV, ultra violet

associated protein) 遺伝子のクローニングを行った。また、A-T 患者由来の細胞ではテロメア (telomere) に関係する染色体異常が以前より知られており¹¹⁾、我々はこの点についても機能解析を進めた。

材料および方法

I. cDNA ライブラリーの作成

雄成鶏 (ニノックス, 金沢) から抽出した精巣を組織変性溶液 (4M グアニジンチオシアン酸, 25 mM クエン酸ナトリウム, 0.1M β -メルカプトエタノール, 0.5% サルコシル) に溶解し、小切片に分断後、迅速にテフロンホモジナイザー (ヤマト科学, 東京) にてホモジナイズした。溶解液は液体窒素 (宇野酸素, 金沢) にて速やかに凍結後、 -80°C で保存した。ホモジナイズしたトリ精巣溶解液 10ml をフタつき遠心管 (Corning, New York, USA) に分注し、2M 酢酸ナトリウム (pH 4.0) を加えて振盪後、平衡化酸性フェノール、クロロホルム-イソアミルアルコール溶液 (98:2) を加えて混合し、氷上で15分放置した。低温遠心機 (トミー精工, 東京) を用いて、 4°C 、3,000回転/分 (rotation per minute, rpm) のもとで20分間遠心し、RNA を含む水層を回収した。これにイソプロピルアルコールを加えて、10分間放置後、 4°C 、3,000rpm で10分間遠心し、沈殿した RNA に組織変性溶液を加えた後、エタノール沈殿を行った。得られた全 RNA は、260nm における吸光度を測定し、1 OD を $40 \mu\text{g/ml}$ として RNA 濃度を測定した。全 RNA 1 mg から、Oligotex-dT30 super (宝酒造, 草津) を用いてポリ A⁺ RNA $20 \mu\text{g}$ を分離した。そのうちポリ A⁺ RNA $5 \mu\text{g}$ から ZAP-cDNA Synthesis キット (Stratagene, La Jolla, USA) を用いてトリ精巣 cDNA ライブラリーを作成した。

II. シークエンス

ヒトおよび酵母の *atm*, *frp* のホモロジー解析により両生物間で保存度の高い領域を選定し、当該アミノ酸配列に対応するヒト cDNA のヌクレオチド配列に基づいて PCR 用デジェネレートプライマー (エスベックオリゴサービス, 筑波) を設定した。ATM プライマーはヒト cDNA の塩基番号 8188-8207 (5'-AAGGGCCGTGATGACCTGAG-3') と 8771-8790 (5'-CATGCCATCCACAATATCTC-3') に、FRP プライマーは 6979-6998 (5'-AAGCCAAAAGATGACCTGAG-3') と 7472-7491 (5'-ACAATTGAAATCTACATGTA-3') に対応する。先に準備したトリ cDNA ライブラリーを用いて PCR を行った。PCR 反応は、DNA サーマルサイクラー (宝酒造) を用いて、熱変性を 95°C 、30秒間、アニーリングを 50°C 、30秒間、DNA の伸長を 72°C 、1分間とし、これを1サイクルとして30サイクルを行った。増幅された DNA 断片を pBluescriptKS(-) ベクター (東洋紡, 大阪) にクローン化し、得られた組み替えプラスミドを分離して塩基配列を決定した結果、*atm*, *frp* は対応するヒト cDNA 領域とそれぞれ 96%, 97.2% の相同性を示したことからトリ ATM, FRP cDNA の部分配列と判定された。

III. ノーザンブロットハイブリダイゼーション

各プラスミドを大量精製後制限酵素消化し、ベクターから切り出された挿入 cDNA 配列を 1% アガロース電気泳動し、UltraClean (Mo Bio Laboratories, Solana Beach, USA) を用いて精製、分離し、Prime-It II ラベリングキット (Stratagene) を用いて、プローブ標品を作成した。

トリ各組織、すなわち脳 (brain)、心臓 (heart)、肺 (lung)、

肝臓 (liver)、膵臓 (pancreas)、精巣 (testis)、腎臓 (kidney) より前記のように抽出したポリ A⁺ RNA $6.6 \mu\text{g}$ を 50% ホルムアミド (和光純薬, 大阪) と 17.5% ホルムアルデヒド (和光純薬) となるようにして、 65°C で10分間変性を行った。引き続き、2.2M ホルムアルデヒド加 1% アガロースゲルを用いて、泳動緩衝液 [0.2M 3-N-モリホリノ-プロパンスルホン酸, 50mM 酢酸ナトリウム (pH 7.0), 10mM EDTA (pH 8.0)] 中、定電圧 55 ボルトにて電気泳動した後、ナイロンメンブランフィルター (Hybond-N+ nylon membrane, Amersham, Greenwich, USA) に転写した。メンブランフィルターを 0.05N 水酸化ナトリウム溶液に5分間浸した後、 $2 \times \text{SSC}$ [0.3M 塩化ナトリウム, 0.03M クエン酸三ナトリウム二水和物] 溶液中で60秒間振盪してアルカリ固定を行った後、紫外線 (ultraviolet, UV) クロスリンカー (Stratagene) を用いて RNA をメンブランに固定した。メンブランをプレハイブリダイゼーション緩衝液 [$5 \times \text{SSC}$, 50% ホルムアミド, $5 \times \text{デンハルト}$ 溶液 (0.1% ポリビニルピロリドン, 0.1% ウシ血清アルブミン, 0.1% フィコール), 0.5% SDS, 1 mg /変性サケ精子 DNA] 中で2時間、 42°C でプレハイブリダイゼーションした。その後、 ^{32}P で標識した *atm* プローブ [603塩基対 (base pairs, bp)] を最終濃度が 1 ng/ml となるようにハイブリバッグ (コスモバイオ, 東京) 内に加え、 42°C で振盪させながら16時間ハイブリダイゼーションを行った。ハイブリダイゼーション後のメンブランを 65°C の $2 \times \text{SSC}$ 溶液中で15分間2回、 $0.5 \times \text{SSC}$ 溶液中で15分間2回洗浄を行い、 -80°C でオートラジオグラフィーを行い、バイオイメージアナライザー (BAS1000) (富士フイルム, 浜松) を用いて、プローブの放射活性を測定した。使用したメンブランは 0.5% SDS 中で、 95°C 、10分間振盪後、再び10分間、室温で滅菌蒸留水中に浸すことにより再ハイブリダイゼーション (rehybridization) に用いた。すなわち、この同じメンブランを用いて *frp* プローブ (513bp)、コントロールとしての β -アクチンプロローブ (486bp) で、再度ノ

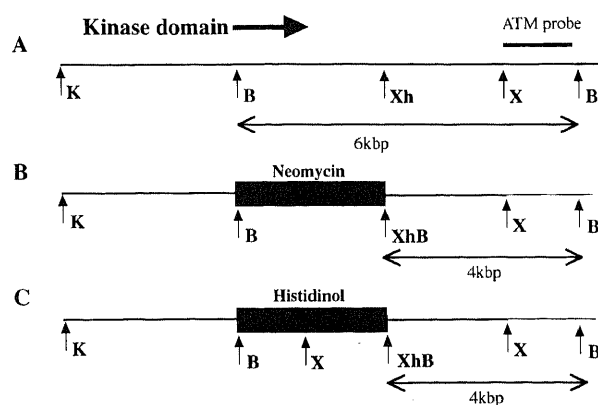


Fig.1. The partial restriction map of the chicken ATM genomic locus surrounding exons which encode the PI3-kinase domain. (A) The wild-type restriction map. The nucleotide length between the two *Bam*HI sites was 6 kbp. (B) The neomycin targeted ATM genomic locus. The closed square indicates the neomycin gene (2 kbp). The nucleotide length between the *Bam*HI and *Xho*I sites was 4 kbp. (C) The genomic locus of ATM targeted by placing the histidinol gene. The closed square indicates histidinol gene (2 kbp). The nucleotide length between the *Bam*HI and *Xho*I sites was 4 kbp. B, *Bam*HI; K, *Kpn*I; X, *Xba*I; Xh, *Xho*I; XhB, *Xho*I and *Bam*HI.

ーザンプロットハイブリダイゼーションを行った。さらに、トリ産卵5, 7, 9, 11日の各全卵から得られたポリA⁺ RNA 3.5 μ gを用い、*atm*, *frp*, β -アクチンについてノーザンプロットハイブリダイゼーションを行った。

IV. ターゲティングベクターの調製

精製したトリ *atm* cDNA (603bp) を鋳型としてトリ肝臓ゲノムライブラリー (Stratagene) をスクリーニングし、塩基配列を決定した。制限酵素処理にてキナーゼドメインを含む部位の制限酵素地図を作成し、エクソン57から59までのおよそ2kbpにわたる領域にネオマイシン (Gibco, Rockville, USA), およびヒスチジノール (Sigma, St. Louis, USA) 各薬剤耐性遺伝子をそれぞれ挿入してトリ *atm* ノックアウト遺伝子を2種類構築した (図1)。ノックアウト遺伝子は、pBluescriptKS(-)ベクターにクローン化し大量精製後、形質転換に使用した。

同様に *frp* cDNA (513bp) を鋳型としてゲノムライブラリーをスクリーニングし、制限酵素処理にてキナーゼドメインを含む部位の制限酵素地図を作成、およそ3kbpにわたる領域に、ネオマイシン、およびヒスチジノール各薬剤耐性遺伝子を挿入し、トリ *frp* ノックアウト遺伝子を2種類構築した (図2)。

V. DT40 細胞の培養およびDNA形質転換

ノックアウト標的細胞は、相同DNA遺伝子組み換えを高率におこすことで知られるトリBリンパ球細胞株DT40細胞 (京都大学医学研究科バイエル寄付講座分子免疫アレルギー学教室より供与) を使用した。細胞は、細胞培養液中 (RPMI1640培地, 10^{-5} M β -メルカプトエタノール, 10% ウシ胎仔血清, 1% トリ血清, 抗生剤としてペニシリンとストレプトマイシンを加えた) で、39.5°C, 5% CO₂のもとで培養を行った 1×10^7 個のDT40細胞を遠心後リン酸緩衝溶液 (pH 7.4) (Phosphate-buffered saline, PBS) にて洗浄し、0.5ml PBSに溶解した。先のノックアウト遺伝子を25~30 μ g加え、氷上10分静置後ジェンパルサー発生装置 (Bio-Rad, Hercules, USA) にて、550ボルト、

25 μ ファラッド (farad) の条件下にエレクトロポレーションを行った。室温で10分放置後、20mlの細胞培養液中で培養した。24時間後、80mlの選択薬剤溶液 (2mg/ml ネオマイシンまたは1mg/ml ヒスチジノール) で懸濁し、96穴プレートに播種した。7日から10日後薬剤耐性コロニーを単離した。ノックアウトの是非は、サザンプロットハイブリダイゼーションで確認した。

VI. サザンプロットハイブリダイゼーション

培養したノックアウト細胞15ml (1×10^7 個) をフタ付遠心管 (Corning, New York, USA) に集め、4°C, 1,000rpmで5分間遠心し細胞を沈澱させた。次に、沈澱物の10~40倍量のDNA抽出溶液 [150mM 塩化ナトリウム, 10mM Tris-塩酸 (pH 8.0), 10mM EDTA] に細胞を懸濁し、10% SDSを100 μ l加えた後、最終濃度が100 μ g/mlになるようにプロテナーゼK溶液 (ニッポンゼン, 東京) を加え、穏やかに混合した。その後、55°Cで1時間、37°Cで16時間振盪した。平衡化中性フェノール [結晶フェノール (和光純薬) を0.1% 8-ヒドロキシキノリン (和光純薬) と1M Tris-塩酸 (pH 8.0) 溶液で平衡化] を加え、室温で20分間振盪混合した後4,000rpmで10分間遠心し上清を回収した。等量のフェノール-クロロホルム溶液で再度抽出を行い、さらにその上清を除去した後、2倍量の100%エタノールを重層した。パスツールピペット (岩城硝子, 船橋) の先端を用いて界面をゆっくりかき回し、糸状に析出したDNAを巻取って回収した。ピペットを70%エタノールに10秒間浸した後、上向きに立てて風乾し、10mlの滅菌蒸留水に浸して16時間放置後DNAを回収した。*atm* ノックアウト細胞から回収したDNA 10 μ gを100単位の *Bam*H I 制限酵素 (東洋紡) で30°C, 24時間処理し、エタノール沈澱を行った。得られた試料6 μ lを、1 \times

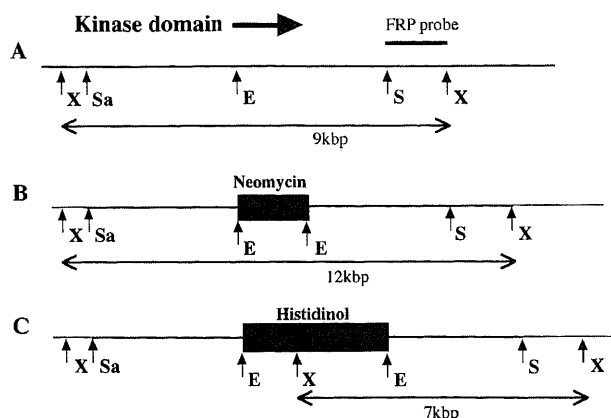


Fig.2. The partial restriction map of the chicken FRP genomic locus surrounding exons which encode the PI3-kinase domain. (A) The wild-type restriction map. The nucleotide length between the two *Xba*I sites was 9kbp. (B) The neomycin targeted FRP genomic locus. The closed square indicates the neomycin gene (2kbp). The nucleotide length between the two *Xba*I sites was 12kbp. (C) The genomic locus of FRP targeted by placing the histidinol gene. The closed square indicates histidinol gene (12kbp). The nucleotide length between the two *Xba*I sites was 7kbp. E, *Eco*RI; S, *Sac*I; Sa, *Sall*; X, *Xba*I.

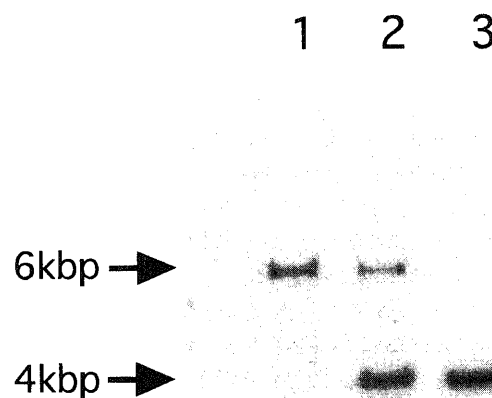


Fig.3. Southern blot analysis of three kinds of genomic DNAs with an ATM DNA probe. The lane 1, parental wild type DT40 cells; Lane 2, targeted heterozygous; Lane 3, homozygous ATM knockout cells. Genome DNAs were digested with *Bam*H I, so that the 4kbp and the 6kbp bands indicate completed and imcompleted in targeting of ATM DNA.

TAE泳動緩衝液 [40 mM Tris, 40 mM 氷酢酸, 1 mM EDTA (pH 8.0)] のもと, 30 ボルトの定電圧で 13×15 cm の 1 % アガロースゲルを用いて電気泳動を行った. 電気泳動マーカーとしてのブロムフェノールブルーが約3分の2程度泳動できたところで泳動を中止した. ゲルを 0.25M 塩酸溶液に浸し室温で10分間振盪し加水分解を行った. その後, ゲルを蒸留水ですすぎ, 変性溶液 (1.5M 水酸化ナトリウム, 0.5M 塩化ナトリウム) 中で30分間振盪した. 変性溶液を除去し, ゲルを表裏逆にしてDNA転写装置上の濾紙の上に置き, 転写メンブラン (Hybond-N+ nylon membrane, Amersham) を上に重ねて, ペーパータオルと1kgの重しを乗せて均一に圧力をかけ, 0.4M 水酸化ナトリウムを転写緩衝液として12時間放置して転写を行った. メンブランを注意深く外して, $2 \times \text{SSC}$ 中で振盪しながら1分間洗浄し, UVクロスリンカーを用いてDNAをメンブランに固定



Fig.4. Northern blot analysis of ATM, FRP and β -actin mRNA in the various chicken tissues. The membrane was probed with the chicken ATM cDNA fragment spanning nucleotides 8188-8790, the chicken FRP cDNA fragment spanning nucleotides 6979-7491, and a β -actin probe. The lane 1, kidney; Lane 2, testis; Lane 3, pancreas; Lane 4, liver; Lane 5, lung; Lane 6, heart; Lane 7, brain.

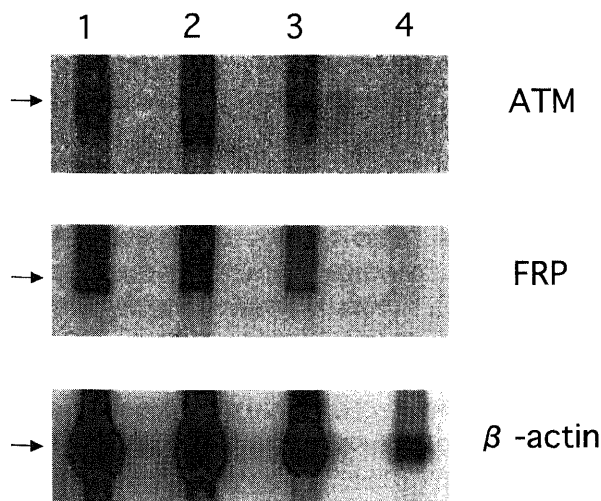


Fig.5. Northern blot analysis of ATM, FRP and β -actin mRNA in the chicken embryos at gestation day-5, 7, 9, 11. The membrane was probed with a 603bp of the ATM cDNA with a 513bp of the FRP cDNA and with a β -actin probe. The Lane 1, 5 days; Lane 2, 7 days; Lane 3, 9 days; Lane 4, 11 days.

化した. さらに, メンブランを 10ml のハイブリダイゼーション液 (1M リン酸緩衝液, 1mM EDTA, 7% SDS) と共にハイブリバッグの中に入れポリシーラーで封入後, 65°C で振盪させながら60分間プレハイブリダイゼーションを行った. ^{32}P で標識した *atm* プロンプ標品を加えて, 先の条件で18時間ハイブリダイゼーションを行った. 終了後, 洗浄液 (40mM リン酸緩衝液, 1% SDS) 中で, 65°C 5分間の洗浄を3回行った後, 65°C 15分間洗浄, -80°C でオートラジオグラフィーを行った (図3).

同様に, *frp* ノックアウト細胞から抽出したDNAを *Xba* I 制限酵素 (東洋紡) で処理した後, *frp* プロンプ標品を用いてサブプロットハイブリダイゼーションを行った.

Ⅶ. ノックアウト細胞の増殖とその速度

atm ノックアウト細胞を 35ml 細胞培養用ディッシュ (Corning) に 1×10^3 個/ml の濃度で播種し, 39.5°C , 5% CO_2 のもとで培養した. その後, 12時間毎72時間までの細胞数を計測した. 計測は, 細胞溶液に 0.4% トリパンプブルー液 (Gibco) を混合し, ノイバウエル血球計算盤 (荳垣医理工業, 東京) を用いて非染色の細胞のみを数えT検定で解析した.

Ⅶ. テロメラーゼ活性の測定

テロメラーゼ活性は, トラッペーゼテロメラーゼ検定キット (Oncor, Gaithersburg, USA) を用いて測定した. DT40細胞, および *atm* ノックアウト細胞の各培養細胞 1×10^6 個を用いて, 遠心後 PBS (-) 溶液で洗浄し, CHAPS 溶液 [10mM Tris-塩酸 (pH 7.5), 1mM MgCl_2 , 1mM EGTA, 0.1mM ベンザミジン, 5mM β -メルカプトエタノール, 0.5% CHAPS, 10% グリセロール] に浮遊後氷上に30分静置して細胞を溶かし, 4°C ,

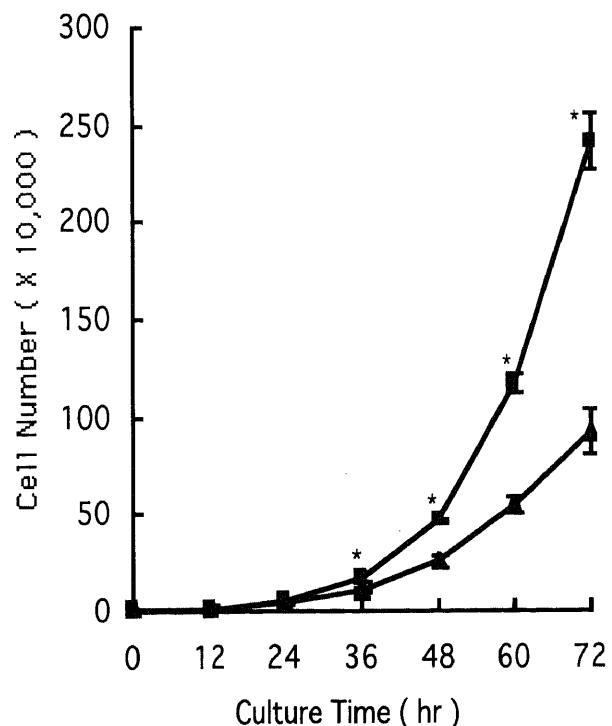


Fig.6. Cell growth curves of DT40 cells and ATM^{-/-} cells. Closed squares and triangles indicate the number of DT40 cells and ATM^{-/-} cells, respectively. * $P < 0.05$. The values are expressed as $\bar{x} \pm \text{SD}$ ($n=3$).

12,000rpmで20分間遠心して、その上清を得た。上清の280nmにおける吸光度を測定し、1ODを0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ として蛋白濃度を計算した。各細胞で試料を3本準備した。すなわち1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ の濃度で非加熱のもの、およびその10倍希釈液、さらに1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ の濃度で85℃、10分間加熱処理したものである。PCR反応は各試料を2 μl ずつ用いて50 μl の系で反応を行った。サーマルサイクラー (PC700) (アステック、福岡) の設定は、30℃、30分間の酵素反応に続いて、熱変性を94℃、30秒間、アニーリングを60℃、30秒間、DNAの伸長を72℃、45秒間とし、これを1サイクルとして30サイクル施行した。PCR反応後のDNA溶液15 μl に泳動用色素液 (0.25%プロモフェノールブルー、0.25%キシレンシアノール、30%グリセロール、5mM EDTA) を加え、12%非変性ポリアクリルアミドゲル [1×Tris-ホウ酸-EDTA(Tris-borate EDTA, TBE), 12%アクリルアミド [12%アクリルアミドモノマー (第一化学薬品、東京), N,N'-メチレンビスアクリルアミド (和光純薬)], 100 μl APS, 10 μl TEMED] で、泳動緩衝液として0.5×TBEを用いて、350ボルト、1時間電気泳動を行った。電気泳動後、ゲルをSYBR Green I (宝酒造) で20分間、遮光振盪して染色を行い、フルオロイメジャー SI (Molecular Dynamics, Sunnyvale, USA) で解析を行った。

成 績

I. トリATM, FRPの分離と構造

PCRで増幅されたcDNA断片をプローブとしてトリ精巢

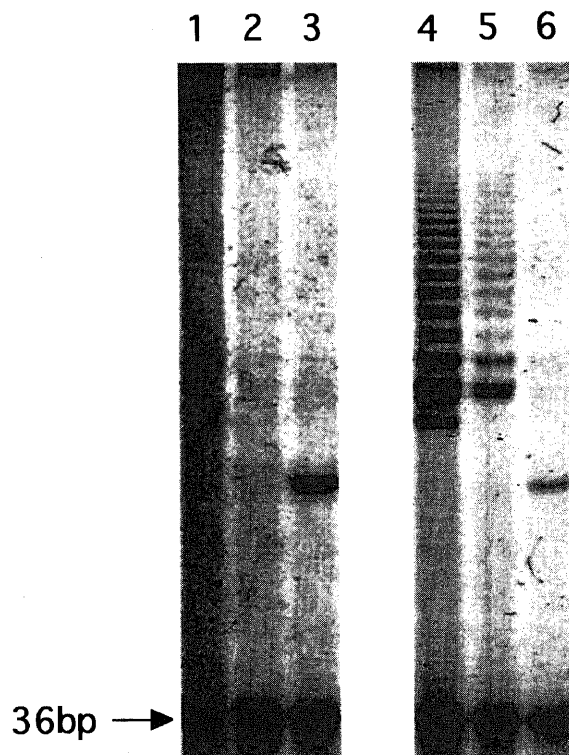


Fig.7. Telomerase activity in DT40 cells and ATM^{-/-} cells. Cell extracts were prepared and assayed by PCR with the telomeric repeat primers at cell extract concentration of 1mg/ml (lane 1 and 4), and 0.1mg/ml (lane 2 and 5). Wild type DT40, Lane 1-3; ATM^{-/-}, Lane 4-6. Heat-treated extracts were assayed as negative control (lane 3 and 6). The 36 bp bands are shown as internal-control bands.

cDNAライブラリーをスクリーニングした結果、フォスファチジルイノシトール3 (phosphatidyl inositol 3, PI3) キナーゼドメインを含むATM cDNAクローンを得た。トリATM cDNAは、ポリA鎖部位を除くと1,077ヌクレオチドからなり、359個のアミノ酸からなる蛋白質をコードし、ヒトATM cDNAとヌクレオチド配列で96%、アミノ酸配列で88%の相同性を有していた。同様にして得られたFRP cDNAは、ポリA鎖部位を除くと1,011ヌクレオチドからなり、337個のアミノ酸からなる蛋白質をコードし、ヒトFRP cDNAとヌクレオチド配列で97.2%、アミノ酸配列で91.6%の相同性を有していた。また、トリATMアミノ酸配列とトリFRPアミノ酸配列の相同性は12.2%、ヒトATMアミノ酸配列とヒトFRPアミノ酸配列の相同性は32%であった。

II. トリATM, FRPの各組織、発生における発現調節

1. ノーザンブロット法による各組織でのatm, frpの発現

atmのバンドが脳にのみ高発現していた。frpのバンドは脳、精巣で高発現していた。コントロールとしての β -アクチンは各組織で単一バンドとして認められた (図4)。

2. ノーザンブロット法による各発生段階でのatm, frpの発現

atm, frpは、ともに産卵5日の段階で発現を認めた。atmは7日をピークとして高発現し、frpは5日をピークとして徐々に発現量が低下していた。コントロールとしての β -アクチンは、各発生段階で発現が認められた (図5)。

III. atmノックアウト細胞の細胞増殖速度

培養72時間までの計測において、野生型DT40細胞とatmノックアウト細胞の12時間毎に計測した細胞数を図6に示した。36時間目より両群に有意差 ($P < 0.05$) が生じ、72時間目ではatmノックアウト細胞は、野生型DT40細胞の半数以下であり、明らかにその増殖速度は低下していた。

IV. DT40細胞でのatmノックアウトによるテロメラーゼ活性の変化

熱処理にてテロメラーゼを失活させた試料では、36bpの内部コントロールのバンドのみが認められた。熱処理しない試料については、前記の内部コントロールの他に50塩基から始まり6塩基ずつ増加する生成物のラダーパターンが確認された。atmノックアウト細胞のラダーパターンは、野生型DT40細胞のそれと比較して明らかに高い強度を示した (図7)。

考 察

Savitskyら⁹⁾のグループにより1995年ATM遺伝子がクローニングされて以来、A-Tの病因の解明に関する研究が各方面で進められている。1996年にはBarlowら¹²⁾のグループによりATM遺伝子のノックアウトマウスも作成され、その病態や遺伝子治療への検討が急速に行われるようになった。ATM遺伝子のクローニングの意味するものは、A-T患者の診断、治療に加えて、A-Tが神経系、免疫系、内分泌系にまたがった病態をもつことから、これらとの関連の解明、さらに細胞周期¹³⁾¹⁴⁾やDNA修復障害¹⁴⁾¹⁵⁾¹⁶⁾に関連して、発がん機構の解明と予防、治療に新たな知見が得られるであろう点できわめて重要な意義をもつと考えられる。

atm, およびその相同遺伝子frp²⁾¹⁷⁾は、その3'末端側に約1kbpにわたるPI3キナーゼドメインを有している⁷⁾。A-T患者ではPI3キナーゼ領域における変異が大半で、蛋白の短縮

(truncation) を起こすことが現在わかっている¹⁸⁾。今回我々は ATM 遺伝子群の機能解析を行うにあたり、相同 DNA 遺伝子組み換えを起こしやすいトリ B リンパ球細胞株 DT40 細胞を使用した。DT40 細胞は、B リンパ球が多様な抗原特異性を有する抗体を産生する過程で、抗体遺伝子の 1 方向性の DNA 断片の移動 (gene conversion) を継続する細胞株であり、DNA 断片同士が非常に効率よく相同組み換えを起こすという点でユニークなものである。それはどの遺伝子座に対しても同程度の効率で相同組み換えを起こし、転写されていない遺伝子座に対しても効率よく相同組み換えを起こす。また、培養が簡単で表現型が安定であるという特徴もある¹⁰⁾。ただ、DT40 細胞がトリの細胞である以上、その機能解析がヒトにどれだけ還元されるかについてはいくらかの疑問が持たれる。我々は、PI3 キナーゼファミリーである *atm* および *frp* が、酵母からヒトにいたるまで、その機能がよく保存されているという条件のもとで実験を進めた。

まず、トリ精巣由来 cDNA ライブラリーより *atm*、*frp* の各 cDNA の分離を行った。その結果、各蛋白質の PI3 キナーゼドメインを含む約 1kbp の cDNA が得られた。ヒト ATM のアミノ酸残基番号 2729-2930、ヒト FRP の 2326-2497 に相当する領域で、トリ *atm*、*frp* はそれぞれ 96%、97.2% の相同性を有していた。これらの事から PI3 キナーゼ領域が広く生物種の間で保存され、それゆえに生体にとって重要な働きを担うことが示唆された。

次に、分離した *atm*、*frp* の発現量を解析する目的でノーザンブロットハイブリダイゼーションを行った。その結果、組織別発現では *atm* は脳で高発現し、ヒトとは異なった発現パターンを示した。Savitsky ら⁹⁾ の報告では、ヒト *atm* は、脾臓、心臓、脾臓、卵巣、白血球に、また、Chen ら¹⁰⁾ の報告では、マウスで脳、筋、精巣に高発現することが確認されているが、今回のトリの組織別 *atm* 発現様式はマウスのそれと類似していると言える。脳で高発現がみられたことは、A-T の小脳失調、すなわち神経変性に関連する可能性が示唆されるが、現在トリでの A-T モデルが報告されていないため、はっきりとした断定はできない。また、*frp* は脳および精巣で高発現していた。*atm* の相同遺伝子として脳で高発現することと共に、また精巣で高発現が認められたことは、A-T の性機能障害という特徴、すなわち細胞周期の短い生殖細胞において DNA 修復機構が強く働く²⁰⁾ という点において *frp* が密接に結び付くことが示唆された。発生段階別発現では *atm* は産卵 5 日から 7 日をピークとして発現していた。これは、おそらく産卵 5 日ごろから分化を開始するリンパ組織の増殖を反映しているものと思われる²¹⁾。いままでの報告で、10 日以前のトリの ATM mRNA の発現を追った報告は少ないが、産卵 10.5 日の段階で全組織で、生体内局所ハイブリダイゼーションの手法により発現が確認されている。その中でも特に脳、肺で強く発現が認められ、18.5 日では胸腺にも発現が認められている¹⁹⁾。一方、*frp* では 5 日をピークとして徐々に発現量は低下したが、これはコントロールとしての β -アクチンの発現と相関していた。このことから、*atm* と *frp* は、発生における発現の段階で何らかの異なった調節をうけていると考えられた。さらに、*atm*、*frp* の機能を解析する目的でノックアウト細胞を作成したが、*atm* ノックアウト細胞は作成可能であったのに対し、*frp* についてはヘテロのノックアウト細胞までは作成可能であったが、ホモのノックアウト細胞は作成不可能

であった。これは、FRP 遺伝子の欠除が胚細胞致死 (embryonic lethal) につながることを示唆され²²⁾²³⁾、さきの、*atm*、*frp* の両遺伝子が発生の段階で異なった調節をうけるというノーザンブロットハイブリダイゼーションの結果を裏付けるものと考えられた。

Barlow ら¹²⁾ は、*atm* ノックアウトマウスを作成し²⁴⁾、その特徴について報告している。*atm* ノックアウトマウスの体重や線維芽細胞の細胞増殖速度など、成長に関する変化では、正常と比較して明らかに増殖速度が低下すると報告した。また、神経障害についても検討した結果、*atm* ノックアウトマウスは活動性に乏しく、平衡感覚の保持も不十分で小脳失調性歩行を呈していた。性腺細胞も未熟で、最終的にリンパ組織由来の腫瘍で死亡したと報告している。本研究では *atm* ノックアウト細胞での細胞増殖速度を測定したが、野生型細胞のそれと比較して明らかに増殖速度の低下を認め先の報告と一致していた。

酵母のテロメア反復配列の制御遺伝子 TEL1 は PI3 キナーゼファミリーの 1 つであり、*atm* と最も高い相同性を示すが⁷⁾²⁵⁾、我々はこの点に注目し、機能解析の 1 つとして *atm* ノックアウト細胞でのテロメラーゼ活性を測定した。テロメア DNA は脊椎動物の TTAGGG などチミジンとグアニンに富む単純な塩基配列の直列繰り返しから成っている。その長さは、セントロメアの塩基配列とは比較にならない程短く、従って TRF (telomere repeat factor) などのテロメア構成蛋白質の細胞あたりの存在量もきわめて少ない²⁶⁾。テロメアおよびその長さの調節酵素テロメラーゼは、その働きとして、すでに存在するテロメア末端を伸長させて染色体を安定に維持することと、テロメア配列を持たない 2 本鎖切断点 DNA 末端に新たにテロメア配列を付加して修復する機能があることがわかっている²⁷⁾。一般にがん細胞においてテロメアの長さが正常細胞と比較して減少し、逆にテロメラーゼ活性は増加するとされている²⁷⁾。以前より、A-T 患者由来の細胞で染色体のテロメア合着 (telomeric fusion) が頻発することは知られていたが²⁸⁾、病因などとの関係が明らかでなく診断の指標にはなっていなかった²⁹⁾。Metcalf ら³⁰⁾ は、A-T 患者の細胞を用いて、そのテロメア長およびテロメラーゼ活性を測定した結果、テロメア長の短縮とテロメラーゼ活性の存在を確認している。また、Smilenov ら²²⁾ は、ヒト RKO 腫瘍細胞を用いて、ATM ドミナントネガティブ (dominant-negative) の状態の細胞を作成し、テロメア長およびテロメラーゼ活性を測定した。実験的に作り出したこの系において、テロメア長は短縮したが、テロメラーゼの活性に大きな変化は認められていない。

本研究でノックアウトした細胞では、野生株と比較しても有意にテロメラーゼ活性が上昇していた。これは ATM 遺伝子がテロメラーゼ活性の発現に対し抑制的に働く可能性を示唆する。

結 論

1. PI3 キナーゼファミリーに属する *atm*、*frp* のトリ cDNA を分離し、それらがコードする蛋白の構造を明らかとした。
2. トリ *atm* および *frp* の発現量を組織別に検討した結果、トリ *atm* は、脳に、トリ *frp* は脳、精巣で高発現していた。
3. トリ *atm* および *frp* の発現量を発生段階別に検討した結果、ともに産卵 5 日の段階で発現を認めた。*atm* は 7 日をピークとして高発現し、*frp* は 5 日をピークとして徐々に発現量が低

下していた。

4. トリATM遺伝子をトリBリンパ球細胞株DT40細胞でノックアウトした結果、その増殖速度は野生株と比較して有意に低下していた。

5. *atm* ノックアウト細胞のテロメラーゼ活性は、野生株と比較して明らかに増加していた。

以上より、トリ *atm* およびその相同遺伝子 *frp* は発生の初期段階より発現し、特に脳に強く発現したことはこの遺伝子群が小脳失調などの神経変性に関連することが示唆され、また、その機能として、細胞増殖の抑制と細胞の癌化に関連するテロメラーゼ活性を抑制する可能性が示唆された。

謝 辞

稿を終えるに臨み、本研究に貴重な御意見を賜りました金沢大学医学部医学科外科学第一講座 渡辺洋宇教授に感謝いたします。また、御指導と本論文の御校閲を賜りました恩師 金沢大学がん研究所細胞制御研究部門細胞分子病態研究分野 山本健一教授に深甚なる謝意を表します。また、本研究にあたり御支援と御協力を頂きました金沢大学外科学第一講座の諸先生、御助言を戴きました高尾宣昭先生をはじめ、金沢大学がん研究所細胞制御研究部門細胞分子病態研究分野の諸先生に厚く御礼申し上げます。

文 献

- 1) Gatti RA, Berkel I, Boder E, Braedt G, Charmley P, Concannon P, Ersoy F, Foroud T, Jaspers NG, Lange K, Lathrop GM, Leppert M, Nakamura Y, O'Connell P, Paterson M, Salser W, Sanal O, Silver J, Sparkes RS, Susi E, Weeks DE, Wei S, White R, Yoder F. Localization of an ataxia-telangiectasia gene to chromosome 11q22-23. *Nature* 336: 577-580, 1988
- 2) Cimprich KA, Shin TB, Keith CT, Schreiber SL. cDNA cloning and gene mapping of a candidate human cell cycle checkpoint protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 2850-2855, 1996
- 3) Vorechovsky I, Luo L, Lindblom A, Negrini M, Webster AD, Croce CM, Hammarstrom L. ATM mutations in cancer families. *Cancer Res* 56: 4130-4133, 1996
- 4) FitzGerald MG, Bean JM, Hegde SR, Unsal H, MacDonald DJ, Harkin DP, Finkelstein DM, Isselbacher KJ, Haber DA. Heterozygous ATM mutations do not contribute to early onset of breast cancer. *Nat Genet* 15: 307-310, 1997
- 5) Swift M, Morrell D, Massey RB, Chase CL. Incidence of cancer in 161 families affected by ataxia-telangiectasia. *N Engl J Med* 325: 1831-1836, 1991
- 6) Savitsky K, Bar-Shira A, Gilad S, Rotman G, Ziv Y, Vanagaite L, Tagle DA, Smith S, Uziel T, Sfez S, Ashkenazi M, Pecker I, Frydman M, Harnik R, Patanjali SR, Simmons A, Clines GA, Sarti A, Gatti RA, Chessa L, Sanal O, Lavin MF, Jaspers NG, Taylor AM, Arlett CF, Miki T, Weissman SM, Lovett M, Collins FS, Shiloh Y. A single ataxia telangiectasia gene with a product similar to PI-3 kinase. *Science* 268: 1749-1753, 1995
- 7) Savitsky K, Sfez S, Tagle DA, Ziv Y, Sarti A, Collins FS, Shiloh Y, Rotman G. The complete sequence of the coding region of the ATM gene reveals similarity to cell cycle regulators in different species. *Hum Mol Genet* 4: 2025-2032, 1995
- 8) Morgan SE, Kastan MB. p53 and ATM: cell cycle, cell death, and cancer. *Adv Cancer Res* 71: 1-25, 1997
- 9) Barlow C, Brown KD, Deng CX, Tagle DA, Wynshaw-Boris

- A. Atm selectively regulates distinct p53-dependent cell-cycle checkpoint and apoptotic pathways. *Nat Genet* 17: 453-456, 1997
- 10) 武田俊一. 高頻度でターゲットインテグレーションを起こすニワトリB細胞株. 免疫 1994-1995: 172-179, 1995
- 11) Vaziri H, West MD, Allsopp RC, Davison TS, Wu YS, Arrowsmith CH, Poirier GG, Benchimol S. ATM-dependent telomere loss in aging human diploid fibroblasts and DNA damage lead to the post-translational activation of p53 protein involving poly(ADP-ribose) polymerase. *EMBO J* 16: 6018-6033, 1997
- 12) Barlow C, Liyanage M, Moens PB, Deng CX, Ried T, Wynshaw-Boris A. Partial rescue of the prophase I defects of atm-deficient mice by p53 and p21 null alleles. *Nat Genet* 17: 462-466, 1997
- 13) Morgan SE, Lovly C, Pandita TK, Shiloh Y, Kastan MB. Fragments of ATM which have dominant-negative or complementing activity. *Mol Cell Biol* 17: 2020-2029, 1997
- 14) Meyn MS. Ataxia-telangiectasia and cellular responses to DNA damage. *Cancer Res* 55: 5991-6001, 1995
- 15) Xu Y, Baltimore D. Dual roles of ATM in the cellular response to radiation and in cell growth control. *Genes Dev* 10: 2401-2410, 1996
- 16) Keegan KS, Holtzman DA, Plug AW, Christenson ER, Brainerd EE, Flaggs G, Bentley NJ, Taylor EM, Meyn MS, Moss SB, Carr AM, Ashley T, Hoekstra MF. The Atr and Atm protein kinases associate with different sites along meiotically pairing chromosomes. *Genes Dev* 10: 2423-2437, 1996
- 17) Hoekstra MF. Responses to DNA damage and regulation of cell cycle checkpoint by the ATM protein kinase family. *Current Opinion in Genetics&Development* 7: 170-175, 1997
- 18) Gilad S, Khosravi R, Shkedy D, Uziel T, Ziv Y, Savitsky K, Rotman G, Smith S, Chessa L, Jorgensen TJ, Harnik R, Frydman M, Sanal O, Portnoi S, Goldwicz Z, Jaspers NG, Gatti RA, Lenoir G, Lavin MF, Tatsumi K, Wegner RD, Shiloh Y, Bar-Shira A. Predominance of null mutations in ataxia-telangiectasia. *Hum Mol Genet* 5: 433-439, 1996
- 19) Chen G, Lee EYHP. The product of the ATM gene is a 370-kDa nuclear phosphoprotein. *J Biol Chem* 271: 33693-33697, 1996
- 20) Barlow C, Hirotsune S, Paylor R, Liyanage M, Eckhaus M, Collins F, Shiloh Y, Crawley JN, Ried T, Tagle D, Wynshaw-Boris A. Atm-deficient mice: a paradigm of ataxia-telangiectasia. *Cell* 86: 159-171, 1996
- 21) Vainio O, Imhof BA. The immunology and developmental biology of the chicken. *Immunol Today* 16: 365-370, 1995
- 22) Smilenov LB, Morgan SE, Mellado W, Sawant SG, Kastan MB, Pandita TK. Influence of ATM function on telomere metabolism. *Oncogene* 15: 2659-2665, 1997
- 23) Pecker I, Avraham KB, Gilbert DJ, Savitsky K, Rotman G, Harnik R, Fukao T, Schrock E, Hirotsune S, Tagle DA, Collins FS, Wynshaw-Boris A, Ried T, Copeland NG, Jenkins NA, Shiloh Y, Ziv Y. Identification and chromosomal localization of atm, the mouse homolog of the ataxia-telangiectasia gene. *Genomics* 35: 39-45, 1996
- 24) Xu Y, Ashley T, Brainerd EE, Bronson RT, Meyn MS,

- Baltimore D. Targeted disruption of ATM leads to growth retardation, chromosomal fragmentation during meiosis, immune defects, and thymic lymphoma. *Genes Dev* 10: 2411-2422, 1996
- 25) Zakian VA. What do they tell us about functions of the human gene? *Cell* 82: 685-687, 1995
- 26) Chong L, van Steensel B, Broccoli D, Erdjument-Bromage H, Hanish J, Tempst P, de Lange T. A human telomeric protein. *Science* 270: 1663-1667, 1995
- 27) Ishikawa F. Telomere crisis, the driving force in cancer cell evolution. *Biochem Biophys Res Commun* 230: 1-6, 1997
- 28) Hecht F, Hecht BK. Cancer in ataxia-telangiectasia patients. *Cancer Genet Cytogenet* 46: 9-19, 1990
- 29) Pfeiffer RA. Chromosomal abnormalities in ataxia-telangiectasia (Louis Bar's syndrome). *Hum Genet* 8: 302-306, 1970
- 30) Metcalfe JA, Parkhill J, Campbell L, Stacey M, Biggs P, Byrd PJ, Taylor AM. Accelerated telomere shortening in ataxia-telangiectasia. *Nat Genet* 13: 350-353, 1996

Expression and Role of the ATM Gene Family: Analysis of the Expression Patterns of Chicken ATM and FRP Genes, and Enhanced Telomerase Activity in Chicken ATM^{-/-} Cells Hideaki Katoh, Department of First Surgery and Department of Molecular-Pathology, School of Medicine and Cancer Institute, Kanazawa University, Kanazawa 920-8640 — *J. Jusen Med Soc.*, **108**, 116 — 123 (1999)

Key words ataxia-telangiectasia, ataxia-telangiectasia mutated, phosphatidylinositol-3 kinase, FKBP-rapamycin associated protein, telomerase activity

Abstract

Ataxia-telangiectasia (A-T) is a human autosomal recessive disorder classified as a primary immunodeficient disease. The various clinical features include neurological degeneration, immunodeficiency, predisposition to cancer, hypersensitivity to ionizing radiation, and premature aging. The chicken homologs for the disease gene ATM (ataxia-telangiectasia mutated) cDNA and related FRP (FKBP-rapamycin associated protein) cDNA were cloned. Expression of the ATM and FRP genes was analyzed in chicken tissues. While the levels of ATM mRNA expression were high only in the brain, FRP mRNA levels were high in the heart and testis as well as the brain. Expression of the ATM and FRP genes after 5, 7, 9, 11 days gestation was also examined. ATM mRNA levels were increased markedly of 7 days, while FRP mRNA levels were high at 5 days. The ATM gene was disrupted the targeted homologous recombination in chicken DT40 cells. ATM^{-/-} cells grew slowly compared to the parental DT40 cells. Further, telomerase activity was elevated in ATM^{-/-} cells. These results suggest that chicken ATM and FRP are regulated in different ways in the early development stage for chickens and that ATM inhibits the telomerase activity.